

VALIDAÇÃO EM LABORATÓRIO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ADIPATO E FTALATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) UTILIZADOS COMO PLASTIFICANTES EM FILMES FLEXÍVEIS DE PVC

Andréia Artur Esteves e Soraia Vilela Borges

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 5, 23890-000 Seropédica - RJ, Brasil

Shirley Abrantes*, Maryanna Gerth Silveira e Cyllene de Matos Ornelas da Cunha Corrêa de Souza

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 12/9/05; aceito em 2/3/06; publicado na web em 26/9/06

VALIDATION IN LABORATORY OF THE ANALYTICAL METHOD TO DETERMINE DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE AND ADIPATE UTILIZED AS PLASTICIZERS IN PVC FILMS. The validation of analytical methods was carried out for di-(ethylhexyl) phthalate (DEHP) and adipate (DEHA) the determination of in PVC films. The level of DEHP and DEHA in samples was determined by leaving the film in contact with n-heptane during 48 hours and analysis in a gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector and fused silica column with 5% phenylmethyl silicone in the dimensions 30 m x 0.53 mm x 2.65 mm. The results for detection and the quantification limits were smaller than the restriction limits. The recovery rates of DEHP and DEHA were, respectively, 69.10 and 75.30 %.

Keywords: di-(2-ethylhexyl) phthalate; di-(2-ethylhexyl) adipate; PVC film.

INTRODUÇÃO

A validação de métodos analíticos é um importante requisito para dar suporte às atividades de metrologia em análise química e de garantia da qualidade dos produtos nas indústrias. Ao tratar de plastificantes em filmes flexíveis de PVC, existe uma lacuna quanto à existência de métodos analíticos para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila), a qual este trabalho visa sanar.

A importância desta pesquisa está no fato dos ésteres do ácido ftálico (ésteres dialquila ou alquil arila do ácido 1,2-benzenodicarboxílico), usualmente chamados de ésteres ftálicos ou apenas ftalatos¹, serem amplamente utilizados como plastificantes para aumentar a flexibilidade e a viabilidade de polímeros com alto peso molecular. Além disso, um quarto dos plastificantes produzidos corresponde ao ftalato de di-(2-etil-hexila), DEHP. Os ftalatos são um grupo bem conhecido de plastificantes necessários para transformar o poli-(cloroeto de vinila) (PVC) em materiais plásticos flexíveis. A maioria dos produtos de PVC contém o plastificante DEHP variando de 30 a 80% (m/m). Como o DEHP, não é quimicamente ligado ao plástico, é uma séria fonte de contaminação pela simples difusão para os meios ou fluidos em contato.

Reconhecendo a toxicidade do DEHP, a US EPA ("Environmental Protection Agency") fixou a concentração do mesmo em água em 6 ppb e o uso de plastificantes tóxicos foi proibido em brinquedos que vão à boca de crianças².

O PVC é um dos polímeros mais usado por ser facilmente processado, as matérias-primas envolvidas na sua formulação têm custo relativamente baixo e apresentam uma grande variedade de propriedades. Em virtude dos possíveis efeitos toxicológicos dos ftalatos, estão sendo substituídos por substâncias alternativas em produtos flexíveis de PVC. O adipato de di-(2-etil-hexila), DEHA, é um substituto dos ftalatos, amplamente utilizado como plastificante em filmes de PVC para materiais que acondicionam alimentos.

No caso da determinação de DEHP e DEHA, em filmes flexíveis de PVC, não existe nenhum método analítico validado publicado que utilize a técnica de cromatografia³ gasosa. A resolução nº 105 de 19 de maio de 1999 da Agência de Vigilância Sanitária estabelece, para material de PVC contendo DEHP como plastificante, um teor máximo de 3% (m/m) na matéria plástica, se em contato com alimentos gordurosos. Porém, a mesma regulamentação não estabelece limite de restrição para DEHA.

Assim, o desenvolvimento e a validação de metodologia de determinação de DEHP e DEHA em filmes de PVC é uma carência presente no desempenho das atividades laboratoriais, pois o objetivo maior de um laboratório é alcançar resultados analíticos plenamente confiáveis. O profissional deve buscar atingir um produto final que esteja isento de qualquer dúvida ou desconfiança razoável no que seja concernente à exatidão e à precisão do mesmo⁴. Para isso, os métodos utilizados devem ostentar uma precisão adequada para os propósitos a que se destinam. No alcance desta confiabilidade, dentre as várias etapas necessárias na execução de qualquer programa de controle e segurança de qualidade analítica, é fundamental o uso de um método analítico validado, o que torna relevante a busca da validação deste método analítico, que até então inexistia, no campo da determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC⁵.

Dessa forma, a validação de métodos analíticos é o processo que fornece uma evidência de que o método é confiável ao que se aplica⁶. Sendo assim o laboratório, ao empregar métodos de ensaio químicos específicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implementá-los⁶. Perseguindo-se o objetivo deste trabalho, foi desenvolvido e validado no laboratório um método analítico para determinação de teores de DEHP e DEHA em PVC, sobre o qual discorreremos a seguir.

*e-mail: shirley@incqs.fiocruz.br

PARTE EXPERIMENTAL

Solventes e padrões

As substâncias utilizadas para elaboração da curva analítica foram os padrões adipato de di-(2-hetil-hexila) e ftalato de di-(2-hetil-hexila), ambos com 99% de pureza da Aldrich e como solvente empregou-se o n-heptano para cromatografia em fase líquida, fornecido pela Merck.

Vidrarias utilizadas

As vidrarias utilizadas foram balão volumétrico de 100 mL, frasco tipo penicilina de 22 mL, pipeta Pasteur, bureta de 25 mL, microsiringa de 10 µL, funil analítico de vidro raiado de 60°, 75 mm de diâmetro e 15 cm de haste.

Equipamentos

Os parâmetros analisados para validação de metodologia foram realizados em cromatógrafo a gás (CG) Shimadzu 14 A, com detector para ionização em chama, equipado com coluna de sílica fundida com 5% de fenilmetilsilicone nas dimensões 30 m x 0,53 mm x 2,65 µm.

Para pesagem foi utilizada a balança analítica Sartorius modelo R-200 D, com resolução de 0,001 mg.

Amostras

As 51 amostras de filmes flexíveis de PVC empregadas foram obtidas em diferentes estabelecimentos comerciais do Rio de Janeiro, recolhidas pelo SMS/RJ/Superintendência de Controle de Zoonoses.

Foi utilizado um material de referência fornecido pela Sansuy S.A. Indústria de Plásticos, cujas peças possuem o tamanho de 10 x 10 cm e, cuja concentração de DEHA e DEHP é de 22,09% (m/m), respectivamente.

Procedimento

Inicialmente, analisou-se o desempenho de quatro métodos diferentes já existentes, a fim de selecionar o que mais se adequava ao objetivo perseguido por este trabalho, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de métodos

SOLVENTE	CONDIÇÕES	RELAÇÃO	REF.
Diclorometano	60 °C/16 h (Soxhlet)	1 g/100 mL	7
Heptano	24° C/2 d	20 g/40 mL	8
Hexano	30 °C/1 h (Ultra-som)	1 dm ³ /20 mL	9
Clorofórmio	24 °C/1 h	0,01 g/10 mL	10

Deve-se explicitar que, para cada método considerado para análise de DEHP, foram realizadas duas extrações a fim de fundamentar a escolha de um método ou não.

Preparo das amostras

Em virtude do filme de PVC ser de espessura da ordem de 8 a 12 µm a relação de amostra para solvente descrita no trabalho de Abrantes e Duarte⁸ foi diminuída, possibilitando o contato do material com o heptano.

Assim, o filme de PVC foi cortado em quadrados de aproximadamente 1 cm², dos quais foram pesados 100 mg de amostra em

frasco tipo penicilina de 22 mL e adicionados 10 mL de N-heptano, que permaneceu em contato com as amostras por 48 h.

Após esse período, a solução restante foi transferida quantitativamente e avolumada para um balão volumétrico de 100,00 mL.

Foram injetados 2 µL desta última solução sob as seguintes condições cromatográficas: coluna de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone; Tc = 220 °C; Ti = 350 °C; Td = 300 °C; vazões: N₂ = 5,5 mL/min; Ar = 200 mL/min; H₂ = 25 mL/min; “range 10”;

Este procedimento foi aplicado em triplicata e cada solução resultante foi injetada três vezes, o que totalizou 9 determinações.

Preparo de solução estoque

Solução estoque de adipato de di-(2-etil-hexila) e solução estoque de ftalato de di-(2-etil-hexila): foram pesados em balança analítica aproximadamente 100 mg do padrão de DEHA (111,0 mg) e de DEHP (130,4 mg) que, posteriormente, foram solubilizados em 100 mL de n-heptano em balão volumétrico. Os padrões de DEHP e DEHA possuem 99% de pureza, sendo necessária a correção de suas respectivas massas.

Preparo de soluções de trabalho

A partir de soluções estoque de DEHA e DEHP foram preparadas cinco soluções por diluições. Os volumes foram tomados com o auxílio de bureta de 25 mL e as soluções foram avolumadas com n-heptano em balão volumétrico de 100 mL. A faixa de concentração foi de 59,4 a 221,0 mg/L e de 5,0 a 210,3 mg/L para DEHA e DEHP, respectivamente.

Linearidade da curva analítica

A curva analítica foi determinada com a injeção inicial de n-heptano para observar se havia algum interferente. Posteriormente injetaram-se todas as soluções de trabalho, para a obtenção da curva analítica. Através dos cromatogramas obtidos foram medidas as áreas dos picos correspondentes nos tempos de retenção do DEHA e DEHP em relação aos pontos de concentração e foi construída a curva analítica a partir das áreas contra as concentrações das soluções de trabalho.

Foram utilizadas as condições cromatográficas descritas no preparo das amostras.

Homoscedasticidade da curva analítica

Foram preparadas três soluções de trabalho de cada ponto de concentração das curvas de calibração do DEHP e DEHA, respectivamente, e analisadas sob as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente. Para a determinação da homoscedasticidade da curva analítica foram calculadas as respectivas variâncias das respostas das áreas relativas a cada concentração. Posteriormente, foi feito o teste de Cochran (C cal) e o valor calculado comparado com o C tabelado em nível de confiança de 95%, utilizando a seguinte fórmula:

$$C \text{ cal} = s^2 \text{ maior} / \Sigma s^2$$

onde: s² – maior valor das variâncias; Σs² – somatório das variâncias.

Seletividade

Para verificação da seletividade utilizou-se a coluna de 50% fenilmetilsilicone, sob as seguintes condições cromatográficas: Tc =

190 °C, $T_i = 240$ °C, $T_d = 300$ °C; com os seguintes fluxos dos gases: $f_{N_2} = 5,5$ mL/min, $f_{H_2} = 25$ mL/min e $f_{Ar} = 200$ mL/min, para análise das alíquotas em heptano obtidas no item preparo das amostras.

Foi verificada a seletividade pelo não surgimento de outros picos, além do DEHA e DEHP.

Através da análise concomitante de 51 amostras de filmes de PVC seguindo o procedimento analítico descrito no item preparo das amostras, verificou-se não haver interferentes nas amostras analisadas.

Limite de detecção (LD)

Para a realização deste parâmetro foram analisadas seis vezes a menor concentração das soluções de trabalho utilizadas na confecção das curvas analíticas.

Para efeito de cálculo foi utilizada a equação $LD = 3 \times$ desvio padrão.

Limite de quantificação (LQ)

Para a realização deste limite foram analisadas seis vezes a menor concentração das soluções de trabalho obtidas nas curvas analíticas e para o cálculo foi utilizada a equação $LQ = 10 \times$ desvio padrão.

Taxa de recuperação

Pesaram-se aproximadamente 100 mg da amostra de referência de filme de PVC em triplicata. As amostras foram colocadas em contato com 10 mL de n-heptano em frasco tipo penicilina, onde permaneceram durante 48 h para se efetuar sua completa extração. Após este período, o extrato foi transferido para balão volumétrico de 100 mL. Retirou-se uma alíquota que foi injetada no cromatógrafo à gás, em triplicata. A taxa de recuperação foi determinada pela fórmula

$$R(\%) = \frac{(C_1) \times 100}{C_2}$$

onde $R(\%)$ – taxa de recuperação; C_1 – concentração determinada experimentalmente da amostra; C_2 - concentração teórica da amostra.

Nota: As amostras de referência utilizadas ou contêm 22,09% (m/m) de DEHA ou 22,09% (m/m) de DEHP, que foram previamente adicionadas na confecção desses filmes.

Repetitividade

Foi realizada analisando-se 3 amostras de referência, em triplicata, conforme os preceitos da “International Conference on Harmonization”¹¹ e foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas, calculando-se o desvio padrão de repetitividade. Foi calculado, também, o limite de repetitividade (r) que, para um nível de confiança de 95%, é calculado por

$$r = 2,8 \times s_r$$

onde: s_r - desvio-padrão de repetitividade associada aos resultados considerados.

Precisão intermediária

O estudo da precisão intermediária foi realizado analisando-se as amostras de referência em triplicata, analisadas pelo mesmo analista em três dias alternados. A precisão intermediária foi expressa pela fórmula com as definições dos itens

$$s_{i(t)} = \sqrt{1/(t-1) \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

onde: $s_{i(t)}$ – desvio padrão de precisão intermediária (onde o símbolo relativo à condição intermediária de precisão aparecer entre parênteses, significa tempos diferentes); t – total de amostras ensaiadas; n – total de ensaios efetuados por amostra; j – n° da amostra, $j = 1, t$; k – n° do ensaio da amostra j , $k = 1, n$; y_{jk} - valor do resultado k para a amostra j .

Robustez

As amostras de referência foram analisadas em triplicata, sendo colocadas em contato com o solvente por diferentes períodos de 48, 72 e 120 h.

A verificação dos resultados foi realizada mediante a utilização do teste t de Student, de acordo com as fórmulas abaixo, com nível de confiança de 95%:

$$t = \frac{X_r - X_i}{s_a / \sqrt{1/n_i + n_r}} \quad e \quad s_a = \sqrt{\frac{(n_i - 1)s_i^2 + (n_r - 1)s_r^2}{n_i + n_r - 2}}$$

onde: X_r – média dos resultados de tempo de 72 e 120 h; X_i – média dos resultados de tempo de 48 h; s_a – desvio padrão agregado; s_i^2 - variância dos resultados no tempo de 48 h; s_r^2 - variância dos resultados no tempo de 72 e 120 h; n_i - número de determinações no tempo de 48 h; n_r - número de determinações no tempo de 72 e 120 h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro método discriminado na Tabela 1, que emprega a extração com diclorometano, foi considerado impróprio devido à falta de praticidade, não sendo o mesmo exequível para o caso desta pesquisa, pelo fato do mesmo requerer 16 h de extração por Soxhlet, o que poderia acarretar diversos problemas, tais como o ocorrido com a formação de um gel, que tornou difícil a separação do solvente. Sendo assim, após várias tentativas malogradas de filtração, o método mostrou-se inadequado.

Já no caso da extração com utilização de hexano, os resultados também não foram pertinentes ao requerido, tendo em vista que a recuperação obtida nos ensaios não foi tida como satisfatória, ao situar-se em $35,6 \pm 9,3\%$, o que ocasionou seu descarte.

O método que envolve a extração com heptano como solvente manifestou bons resultados, pois a recuperação, ao contrário da com hexano, foi de $69,1 \pm 0,3\%$. Além disso, ele apresenta boa praticidade em sua execução, sendo considerado perfeitamente aplicável.

Outro método que também evidenciou ser proveitoso foi o que faz uso de clorofórmio para a extração, pois a recuperação obtida chegou a $104,6 \pm 5,6\%$, sendo também considerado como possuidor de excelente praticidade, pois o tempo por ele exigido no contato com o solvente é de apenas 1 h, porém o clorofórmio é um poluente ambiental, tornando seu uso não recomendado.

Todavia, dentre todos os métodos analisados, o selecionado para ser empregado neste estudo foi o método com n-heptano⁸, em razão do mesmo já ter sido aplicado com sucesso em outros estudos.

Linearidade

A linearidade diz respeito à idoneidade do método em apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de determinada faixa de aplicação¹².

O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9996 para DEHA e 0,9997 para DEHP, respectivamente. Estes se situam satisfatória-

mente dentro do recomendado pela ANVISA¹³ e pelo INMETRO¹⁴, que estabeleceram como requisito, nesta ordem, o coeficiente ser igual a 0,99 e superior a 0,90.

Verificação da homoscedasticidade da curva analítica

As variâncias dos resultados das áreas dos picos cromatográficos, em relação aos pontos de concentração, são iguais, portanto, as populações dos resultados são homoscedásticas para DEHP e DEHA, sendo analisados através do método de Cochran, conforme apresentado na Tabela 2, onde se verificou a independência das variâncias das respostas das áreas em relação às concentrações das soluções analisadas, verificada pelo valor calculado de C ser menor que o valor tabelado no nível de confiança de 95%.

Tabela 2. Determinação da homoscedasticidade da curva analítica

C calculado (DEHA)	(Cc) = 0,299
C tabelado	(Ct) = 0,684
C calculado (DEHP)	(Cc) = 0,431

Determinação da faixa de trabalho

A faixa de trabalho utilizada foi aquela considerada homoscedástica, cujas concentrações variam de 59,4 a 221,0 mg/L e de 5,0 a 210,3 mg/L para DEHA e DEHP, respectivamente.

Seletividade

Ao se observar a seletividade em um método, deve-se verificar a capacidade deste para avaliar as substâncias em análise na presença de outras que, porventura, possam interferir na sua determinação no caso de amostras complexas¹⁵, garantindo que o pico de resposta seja unicamente do composto desejado, posto que se não houver seletividade¹⁶, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão prejudicadas.

Desse modo, o método demonstrou ser seletivo, uma vez que, não foram observados picos interferentes no tempo de retenção de DEHA e DEHP, quando se utilizou a coluna de 50% de fenilmetilsilicone para análise de filme de PVC, como também na análise das 51 amostras de filme de PVC.

Determinação de DEHA e DEHP

Os limites de detecção e quantificação são parâmetros utilizados na validação de métodos, sendo também conhecido como um dos parâmetros de desempenho analítico¹⁷, características de desempenho¹⁸, e, em outros trabalhos, aparecem como uma das figuras analíticas de mérito¹⁷.

Neste caso, o método é capaz de detectar 0,22% (m/m) de DEHA e 0,21% (m/m) de DEHP, respectivamente, na massa plástica. Os valores de DEHA e DEHP que podem ser determinados de forma quantitativa com precisão e exatidão são 0,74% (m/m) de DEHA e 0,71% (m/m) de DEHP, respectivamente. Estes resultados são adequados para determinação de teores em torno de 22% (m/m) de DEHP e DEHA em filmes de PVC, por serem cerca de 30 vezes menores.

Taxa de recuperação

A taxa de recuperação do DEHP foi de 69,10% e do DEHA foi de 75,30%. A taxa de recuperação encontrada para DEHA apresentou um resultado melhor que o DEHP, devido ao fato de que sua estrutura molecular facilita a extração pelo solvente, além de apresentar me-

nor massa molecular. Na literatura só se encontra referência à determinação da recuperação com fortificações na solução de extração, não se verificando o uso de um material de referência preparado. As taxas de recuperação encontradas, realmente, à primeira vista parecem baixas, levando a pensar que a análise por cromatografia gasosa não seria a técnica analítica mais adequada para esta determinação, tendo-se em conta que os pontos de ebulição de DEHA e DEHP são, respectivamente, 360 e 384 °C. Uma melhoria da recuperação seria derivatizar DEHA e DEHP para uma forma mais volátil ou usar a cromatografia líquida de alta eficiência para analisar, porém, se o detector for por ultravioleta só irá determinar DEHP. A "Association of Official Analytical Chemists International – AOAC" recomenda a faixa de recuperação de 70 a 110% quando os analitos estiverem em concentrações maiores que 1 mg/kg¹⁹.

Repetitividade

Os valores encontrados foram 0,10 e 0,02% (m/m) para DEHA e DEHP, respectivamente; as repetições de análise mostraram pequenas dispersões. Foi calculado também o limite de repetitividade (r) cujo valor encontrado para DEHA foi de 0,28% (m/m) e 0,06% (m/m) para DEHP, respectivamente; estes são os valores máximos de diferença entre duplicatas²⁰.

Precisão intermediária

Os valores encontrados foram 0,18% (m/m) e 0,02% (m/m) para DEHA e DEHP, respectivamente. Tais valores indicam que o método apresenta boa precisão intermediária referente à precisão avaliada sobre a mesma amostra de referência, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mesmo analista, modificando-se apenas o tempo da análise.

Robustez

Os resultados de robustez com a modificação do tempo de contato de 48 para 72 e 120 h, utilizando teste t de igualdade de duas médias para DEHA e DEHP, no tempo de contato de 72 h, foram para os t calculados iguais a 3,05 e 3,46; para DEHA e DEHP, respectivamente, diante de um t tabelado de 4,30 para ambos. Já no caso do tempo de contato de 120 os calculados são de 3,71 e 3,93 para DEHA e DEHP, nesta ordem, com um nível de confiança de 95%. Tal resultado evidencia que o método se mostrou robusto para determinação do teor de DEHA e DEHP até as 120 h de contato da amostra com o solvente.

Um cromatograma típico do método é apresentado na Figura 1.

CONCLUSÃO

Conforme mencionado anteriormente, a determinação de DEHP e DEHA, em filmes flexíveis de PVC, carece de um método analítico que utilize a técnica de cromatografia gasosa. Desse modo, nesta pesquisa, buscou-se desenvolver e validar a metodologia de determinação de DEHP e DEHA em filmes de PVC, a fim de que o trabalho laboratorial disponha de resultados analíticos plenamente confiáveis, no que tange à determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etilhexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC.

Assim sendo, nos trabalhos desenvolvidos nesta pesquisa, os objetivos traçados foram plenamente alcançados, pois a metodologia desenvolvida mostrou ser simples, pouco dispendiosa e, por isso, viável economicamente. O método proposto mostrou, por meio dos parâmetros de validação, ser eficiente e confiável para determinação de DEHP e DEHA, em filmes flexíveis de PVC.

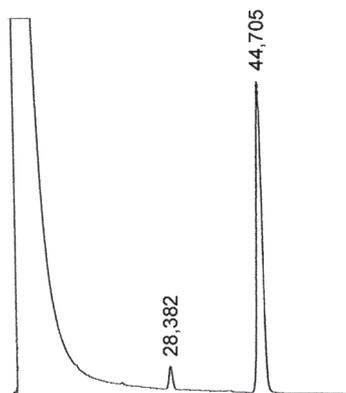


Figura 1. Cromatograma típico da análise de filme de PVC. Os tempos de retenção de 28,382 e 44,705 min correspondem, respectivamente, a DEHA e DEHP

Além disso, por não empregar grandes quantidades de reagentes, este método mostrou também não ser laborioso, em função da alta praticidade presente na sua aplicação e, ainda, a metodologia apresentada mostrou atender todos os requisitos para as operações pretendidas, sendo plenamente possível de ser empregada na atividade laboratorial para qual se propõe.

REFERÊNCIAS

- Gómez-Hens, A.; Aguilar-Caballeros, M. P.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 84.
- Chen, C. Y.; Ghule, A. V.; Chen, W. Y.; Wang, C. C.; Chiang, Y. S.; Ling, Y. C.; *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *231*, 447.
- Morelli-Cardoso, M. H. W.; Lachter, E. R.; Tabak, D.; Abrantes, S.; Moraes, O. M. G.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 70.
- Brittain, H. G.; *Pharm. Technol.* **1998**, junho, 4.
- Horwitz, W.; *Food Addit. Contam.* **1993**, *10*, 61.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia; *Orientações sobre Validação de Métodos*, INMETRO: Rio de Janeiro, 2002.
- Rastogi, S. C.; *Chromatographia* **1998**, *47*, 989.
- Abrantes, S.; Duarte, J.; *Quim. Nova* **1992**, *15*, 228.
- Nerin, C.; Gancedo, P.; Cacho, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1833.
- Kunigami, C. N.; *Desenvolvimento de Metodologia para Identificação por FT-IR e Quantificação por GC/MS de Plastificantes em Filmes de PVC. Norma Técnica - INT. 29/12/98 LAPEP-02/98.*
- ICH Q2B; *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, ICH: Geneva, 1996.
- ICH Q2A; *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, (CPMP/ICH/381/95), 1995.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE n° 899, de 29/05/2003.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia; *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, 2ª ed., INMETRO: Rio de Janeiro, 2003.
- United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24*, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 1999.
- Vessman, J.; Stefan, R. I.; Staden, J. F.; V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T.; Fajgelk, A.; Müller, H.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1381.
- Swartz, M. E.; Krull, I. S.; *Pharm. Technol.* **1998**, *2*, 12.
- Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
- AOAC; *Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals*, AOAC: Washington, 1999.
- ISO 3534-1; *Statistics, vocabulary and symbols - Part 1: Probability and General Statistical Terms*, ISO 3534-1, 1993.